



# AGGIORNAMENTO SULLA RICERCA 2022



# RIEPILOGO E CONTESTO

## INTRODUZIONE

Questo documento rappresenta l'aggiornamento su uno sforzo di ricerca senza precedenti, e sui risultati dirompenti di tale progetto di ricerca internazionale guidato da Jordan's Guardian Angels relativo alle mutazioni dei geni PPP2R5D, PPP2R5C, PPP2R1A - conosciute anche con il nome Sindrome di Jordan. I progressi ottenuti in breve tempo sono a dir poco straordinari grazie al team di ricerca che lavora con grande senso di urgenza per migliorare la vita dei bambini affetti da tale Sindrome (e relative famiglie), e lavora per monitorarne i collegamenti con altre malattie: autismo, epilessia, Morbo di Parkinson, Morbo di Alzheimer e cancro, solo per citarne alcune.

Grazie ad un grande lavoro di collaborazione, aspetto già di per sé notevole nel mondo scientifico, il team di ricerca ha realizzato in breve tempo quello che normalmente richiederebbe un decennio. Sostenuto da Jordan's Guardian Angels, questo progetto globale e le sue basi tracciano un segno indelebile nel campo delle malattie rare.

Ad oggi, le nostre partnership con altri gruppi di malattie rare includono The Rare Epilepsy Network (REN), The EveryLife Foundation, Rare Disease Legislative Advocates (RDLA), Global Genes, Rare Revolution Magazine, Patient Worthy, Extra Lucky Moms, Rare, Rare Disease Legislative Advocates, e molto altro ancora.

Jordan's Guardian Angels sta anche rapidamente diventando un modello per altre fondazioni che iniziano il loro viaggio nel mondo delle malattie rare. I membri del team hanno incontrato altri soggetti che hanno recentemente ricevuto una diagnosi di malattia rara e sperano di avere il successo che sta avendo Jordan's Guardian Angels nel percorso per trovarne un trattamento o una cura. Jordan's Guardian Angels sta facendo la differenza nell'ambiente delle malattie rare e spera che, sostenendo questi gruppi e molti altri ancora, anche loro possano fare lo stesso.

## CONTESTO

La Sindrome di Jordan provoca gravi disturbi dello sviluppo nei bambini in cui viene identificata una mutazione in PPP2R5D, PPP2R5C, PPP2R1A. Alcune varianti di PPP2R5D, PPP2R5C, PPP2R1A sono associate a ritardi dello sviluppo, macrocefalia, ipotonia e autismo. I bambini possono anche soffrire di crisi epilettiche.

L'1 luglio 2021, lo Stato della California ha approvato uno stanziamento generale di fondi per accelerare la ricerca sulla Sindrome di Jordan e per sviluppare potenziali terapie, testandole nella Fase 1 di test clinici. Questa assegnazione di fondi fa seguito al precedente finanziamento del 2018 per la "fase di scoperta scientifica".

Il finanziamento sostiene un consorzio di ricercatori, operanti presso primarie università e istituti di ricerca in tutto il mondo, che hanno competenze specifiche nella ricerca sui geni PPP2R5D, PPP2R5C, PPP2R1A, sulla ricerca applicata ai topi, sulla fenotipizzazione clinica e sugli studi clinici.

I risultati della ricerca condotta fino ad oggi ci hanno fornito una sorta di “cassetta degli attrezzi completa”, necessaria per continuare a lavorare: molto è stato appreso sulla proteina coinvolta, su come si inserisce nei percorsi di segnalazione molecolare nei neuroni, e su come si comporta la proteina mutante nel processo di interferenza con la funzione normale. Sono stati generati topi che hanno molte delle mutazioni chiave PPP2R5D, PPP2R5C, PPP2R1A - e la ricerca si sta ora muovendo in direzione degli studi clinici. In effetti, lo Studio sulla Storia Naturale è già iniziato, e ulteriori studi sono stati condotti in occasione della conferenza delle famiglie di luglio 2022 a New York City. Lo Studio di Storia Naturale è richiesto dalla FDA (l’agenzia americana per gli alimenti e i medicinali) prima che qualsiasi trattamento farmacologico venga approvato.

Il team internazionale di ricercatori sulla Sindrome di Jordan sta lavorando a due terapie d’intervento:

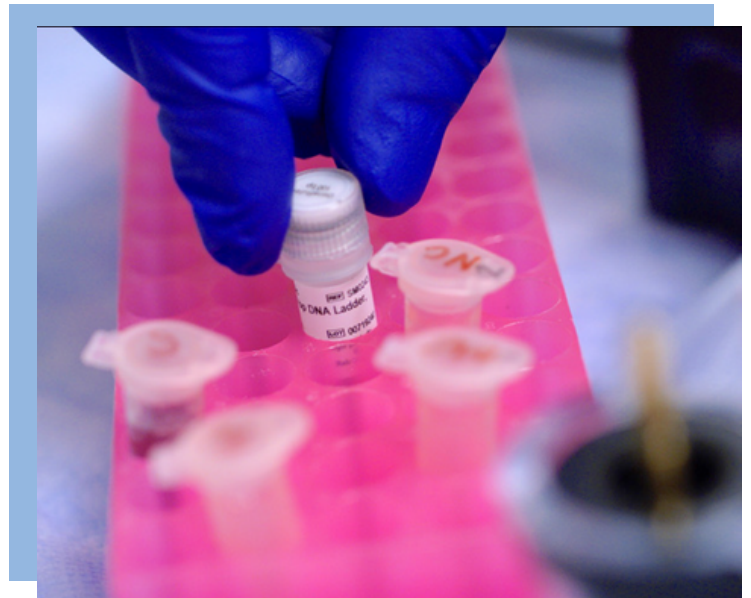
1. Un “farmaco ripositionato” (repurposed drug, cioè già impiegato per altre malattie) già approvato dell’FDA - che interferirà con il percorso aberrante causato dal prodotto proteico mutante del gene PPP2R5D (una fosfatasi).
2. Un intervento genetico, probabilmente un oligonucleotide antisense (ASO), anch’esso progettato per attenuare gli effetti del gene mutante PPP2R5D, PPP2R5C, PPP2R1A.

Possiamo affermare che la ricerca sia una grande collaborazione tra scienziati, medici, figure a sostegno e difesa dei pazienti - e soprattutto le famiglie. La ricerca scientifica parte dalla comprensione della natura del disturbo, dal capire quali caratteristiche in comune hanno i bambini con la Sindrome di Jordan (soprattutto se affetti da varianti diverse) - e anche da sapere dalle famiglie quali considerano essere i sintomi più importanti da tentare di risolvere mediante studi clinici e future terapie. Ringraziamo ognuno di voi per l’inestimabile aiuto offerto al team di ricerca, fondamentale per arrivare insieme ad un trattamento farmacologico e, possibilmente, una cura.



# PUNTI SALIENTI DELLA RICERCA

- Sono stati compiuti progressi significativi per ciascuno dei due approcci di ricerca: trattamento (farmaco) e cura (intervento genetico). Con molto altro da scoprire sulla Sindrome di Jordan, questo ci offre la possibilità di esplorare due percorsi diversi, entrambi in corsa verso risposte potenzialmente incoraggianti.
- Il nostro team di ricerca si riunisce trimestralmente per un workshop di un'intera giornata utile a condividere dati e risultati, scambiarsi idee, e ragionare tutti insieme sul quadro generale.
- La tabella di marcia per la seconda fase della ricerca è a punto. L'obiettivo principale tra i membri del team è spingere per l'approntamento della sperimentazione clinica.
- Individui con la Sindrome di Jordan continuano ad essere arruolati negli Studi di Storia Naturale. Ad oggi sono stati raccolti dati da oltre 120 famiglie in tutto il mondo.
- È stata ampliata la comprensione delle caratteristiche cliniche della Sindrome di Jordan, e sono state definite le correlazioni tra l'attività biochimica e la gravità clinica.
- Sta per essere pubblicato un documento con risultati inerenti a PPP2R5D, PPP2R5C, PPP2R1A, e su come diverse varianti influiscano sugli individui affetti dalla Sindrome.
- Sono state eseguite analisi proteomiche globali quantitative imparziali, fosfoproteomiche, trascrizionali e metaboliche di linee cellulari wild-type e varianti.
- Sono state create ulteriori Cellule Staminali Pluripotenti Indotte (iPSC) e serie alleliche - per ottenere una migliore comprensione delle diverse varianti, delle loro specificità, e del modo in cui si comparano tra loro.
- È stata sviluppata una pletera di anticorpi e nanoanticorpi derivati dagli alpaca, pertinenti agli studi sulla Sindrome di Jordan. I membri del team JGA li stanno utilizzando per gli studi in corso nei loro laboratori.
- Usando la cryo-EM (criomicroscopia elettronica) sono state sviluppate strutture ad alta risoluzione che forniscono una base importante per muoversi alla ricerca di farmaci mirati sulle mutazioni.
- Sono state usate in laboratorio tecnologie di editing genetico a livello cellulare per riparare le mutazioni.



- Studi avanzati sui topi hanno dimostrato che i modelli animali generati offrono una rappresentazione fedele della Sindrome di Jordan, in quanto ricapitolano bene i sintomi più comuni del disturbo. Il nostro team sta usando i topi anche per studiare il legame che esiste tra PPP2R5D, PPP2R5C, PPP2R1A da una parte - e il Morbo di Parkinson dall'altra. Si sta cercando di capire perché si verifica un collegamento con il Morbo di Parkinson, per consentirne il trattamento.
- Farmaci approvati dall'FDA stanno venendo sottoposti a screening, a livello cellulare e nei topi, nella speranza di trovare potenziali farmaci candidati.
- Sono in corso studi comportamentali nei topi PPP2R1A sia in età neonatale che in quella adulta. Il lavoro evidenzia diversi livelli di gravità nei due sottogruppi.
- La coorte di pazienti affetti da PPP2R5C è stata significativamente estesa, e tutte le varianti sono caratterizzate dal legame della subunità A/C, e/o da difetti del legame con liprin-α1. Esistono molte somiglianze sorprendenti tra i soggetti affetti da PPP2R5D e PPP2R5C, sia in termini di caratteristiche cliniche dei pazienti (ad esempio ID/DD, ipotonia, tendenza alla macrocefalia, insorgenza di crisi epilettiche), sia in termini di menomazioni biochimiche delle varianti genetiche.

## JORDAN'S GUARDIAN ANGELS 2022

# AGGIORNAMENTI SU FONDAZIONE E COMUNITÀ

La fondazione Jordan's Guardian Angels sta continuando, giorno dopo giorno, a premere sull'acceleratore. Il team si sta concentrando sulla crescita della comunità della Sindrome di Jordan, sull'ampliamento della risonanza del nome della Fondazione stessa nell'ambiente delle malattie rare, sullo sforzo per raccogliere i fondi necessari a sostenere la ricerca. E questi sono solo alcuni degli impegni quotidiani.

La comunità della Jordan's Guardian Angels è cresciuta fino a raggiungere più di 285 famiglie in oltre 35 paesi del mondo. La comunità online di Facebook continua a crescere su base settimanale. Negli ultimi due anni si sono unite quasi 100 nuove famiglie. Molte delle nostre famiglie sono state indirizzate direttamente alla pagina Facebook dai loro professionisti medici in tutto il mondo.

Man mano che la nostra presenza globale cresce, i membri del team della Jordan's Guardian Angels sono sempre più concentrati sul tema dell'inclusività a favore di tutte le nostre famiglie. Ciò include la creazione del Programma Ambassador - che consiste nell'arruolare membri della nostra comunità in tutto il mondo per garantire che, per ogni famiglia, ci sia supporto a livello linguistico e di risorse. Gli ambasciatori spaziano tra diverse aree geografiche e relative lingue - tra cui spagnolo, francese, tedesco e italiano. Le famiglie possono connettersi con la propria comunità locale e accedere alle relative risorse, nonché partecipare ad eventuali eventi locali virtuali e in presenza. Questa è una grande dimostrazione di come la nostra comunità sia in grado di collaborare per espandersi e supportarsi a vicenda in tutti gli angoli del mondo. Inoltre, molti dei documenti importanti creati da Jordan's Guardian Angels sono ora disponibili in diverse lingue - e altre ne verranno aggiunte.

Continuano a nascere e prosperare occasioni di collaborazione tra Fondazione e comunità. La Fondazione fornisce alle famiglie strumenti e supporto per conoscere la loro diagnosi, vivere il quotidiano, diffondere la conoscenza della Sindrome di Jordan tra i professionisti del campo medico, nelle scuole, e altrove. La Fondazione ha creato un libro per bambini in più lingue che racconta la storia della Sindrome di Jordan, e incoraggia i bambini ad accettare le differenze e fare una nuova amicizia. Sono stati creati kit, per i media e per i professionisti del campo medico, utili a diffondere la conoscenza della Sindrome. Sono state create risorse utili alla raccolta fondi ed anche un opuscolo con gli standard di assistenza suggeriti, che aiuta le famiglie a navigare nella diagnosi della Sindrome di Jordan. I membri del team forniscono anche forum giornalieri, settimanali, bisettimanali, mensili e trimestrali in cui le famiglie possono sostenersi a vicenda.

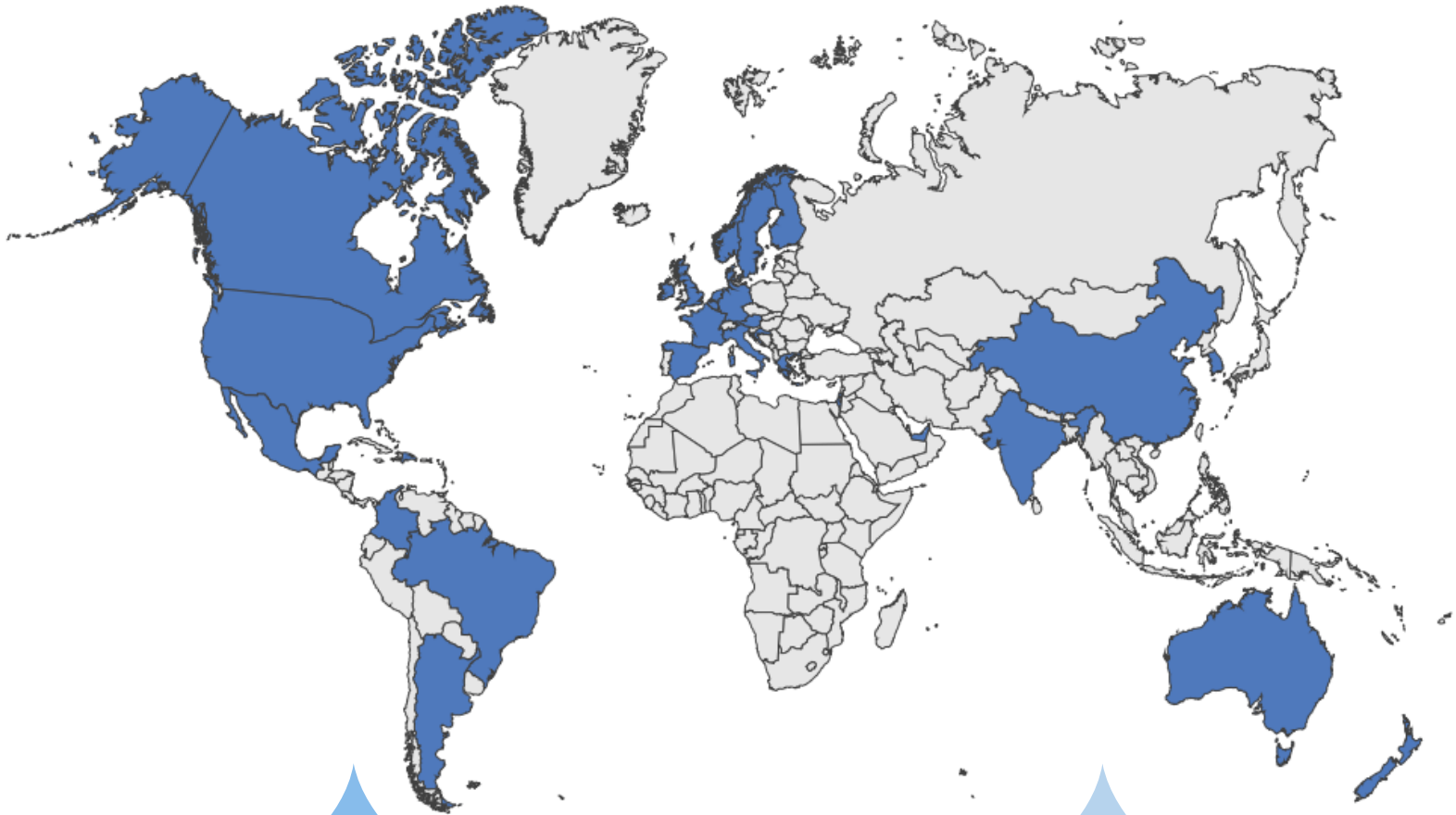
Jordan's Guardian Angels continua a fornire informazioni anche ai professionisti del campo medico. Stanno diventando disponibili sempre più informazioni sulla Sindrome di Jordan ed è imperativo che medici, specialisti della genetica, terapisti, e più in generale chiunque nel campo medico - conosca la Sindrome di Jordan. La Fondazione aggiorna costantemente i database genetici con nuove informazioni, contattando gli ospedali pediatrici cosicché che la Sindrome di Jordan diventi per tutti un nome familiare.

Anche le nostre famiglie stanno lavorando duro per far sì che la ricerca vada avanti, occupandosi di raccolte fondi virtuali o nelle località dove vivono. Il team Jordan's Guardian Angels fa lo stesso, ospitando importanti eventi di raccolta fondi durante tutto l'anno.

Il team di ricerca internazionale di Jordan's Guardian Angels si riunisce regolarmente, in presenza e in incontri virtuali, per condividere dati e scoperte. Il team si riunisce per portare avanti la conversazione, collaborare, e lavorare come una squadra in questo sforzo corale senza precedenti.

A luglio 2022 le nostre famiglie si sono riunite con il team di ricerca per una conferenza in presenza a New York City. Erano presenti più di 300 persone, qualcuna anche virtualmente. In precedenza le nostre famiglie si erano riunite nel marzo del 2019 in California.

## DISTRIBUZIONE DEI CASI NEL MONDO



Più di 350 casi in più di 38 Paesi

Probabilmente, circa 250.000 casi non diagnosticati in tutto il mondo



Scansiona questo QR code con il tuo smartphone per visualizzare una mappa interattiva.

La mappa interattiva è disponibile anche visitando [www.jordanguardianangels.org/our-community/](http://www.jordanguardianangels.org/our-community/)

# AGGIORNAMENTI SULL'OPERA DI DIVULGAZIONE

Nel tentativo di rendere la Sindrome di Jordan e Jordan's Guardian Angels dei nomi familiari, gli sforzi di divulgazione e sensibilizzazione sono in primo piano.

Nel 2021, Jordan's Guardian Angels ha lanciato un podcast chiamato "A Rare Reality", che è stato nominato da Patient Worthy uno dei migliori podcast sulle malattie rare. Il podcast si sforza di essere specifico per la Sindrome di Jordan ma anche esteso alle malattie rare in genere, consentendo ai nostri ascoltatori di godere di un'ampia varietà di argomenti. Il podcast è disponibile su tutte le principali piattaforme, con una versione video disponibile sul sito web di Jordan's Guardian Angels. L'ascolto e il pubblico continuano a crescere di settimana in settimana.

La Fondazione si connette con le famiglie attraverso la nostra newsletter settimanale, e con le varie parti interessate tramite una newsletter trimestrale. Un video blog, "JGA Connection", è disponibile per le famiglie su base trimestrale. Questi canali di contatto consentono alla Fondazione di fornire informazioni nuove e in continua evoluzione: dalla ricerca, alla raccolta fondi, agli inviti all'azione, e tutto il resto.

Il traffico sul nostro sito web sta aumentando ad un ritmo considerevole, e i nostri video sono stati condivisi e visti da centinaia di migliaia di persone in tutto il mondo. Ad oggi, i membri del team della Jordan's Guardian Angels hanno tenuto dozzine di presentazioni a migliaia di persone in vari gruppi che hanno portata locale, regionale e internazionale.

I media nazionali ed internazionali continuano ad offrirci copertura, e seguire il gruppo e i nostri sforzi di ricerca. I principali media e i membri della comunità delle malattie rare continuano a raccontare la nostra storia su stampa, televisione, blog, podcast, e altro ancora. Anche le famiglie della Jordan's Guardian Angels raccontano le loro storie per i nostri podcast e blog. I loro racconti onesti e sinceri continuano ad ispirare.

**Scansiona questi QR code con il tuo smartphone per accedere alle risorse elencate.**

Se stai leggendo in digitale puoi anche cliccare sul codice per visitare la pagina.



Ascolta questo podcast  
con la presenza di JGA



Leggi questo blog con  
la presenza di JGA



Attenzione dei media  
internazionali per JGA



Blog JGA



Podcast JGA



## AGGIORNAMENTO SU DIVULGAZIONE E INFLUENZARE IL MONDO

"Insieme, possiamo cambiare il mondo". Un mantra per Jordan's Guardian Angels. L'attività di divulgazione che il team conduce sta davvero influenzando il mondo, e portando la Fondazione e la Sindrome di Jordan sotto gli occhi di tutti.

I membri del team hanno partecipato alla Rare Disease Week (Settimana delle Malattie Rare) a Capitol Hill spargendo la voce su Jordan's Guardian Angels e Sindrome di Jordan - e sensibilizzando sulla legislazione sulle malattie rare. In molti stati, tra cui California, Colorado, Washington, D.C., c'è un supporto estremamente forte per gli eventi sulle malattie rare e il lavoro di sensibilizzazione.

La Fondazione ha fatto partnership o collaborato con importanti gruppi sulle malattie rare come Rare Epilepsy Network (REN), The Everylife Foundation, Rare Disease Legislative Advocates, Global Genes, Rare Revolution Magazine, Patient Worthy, National Organization of Rare Diseases (NORD), Extra Lucky Moms e Rare. Continua anche la partnership tra Jordan's Guardian Angels e Simons Search Light Foundation. Al gruppo è stato assegnato anche il riconoscimento Guidestar Gold Transparency Rating.

Jordan's Guardian Angels, incontrando altri gruppi, sta anche rapidamente diventando un modello per altre fondazioni che iniziano il loro viaggio nel mondo delle malattie rare. I membri del team hanno incontrato altre persone che hanno recentemente ricevuto una diagnosi di malattia rara e sperano di avere il successo che sta avendo Jordan's Guardian Angels nel percorso per trovare un trattamento o una cura.

La borsa di studio Shine Like Ozzie è solo un altro modo con cui Jordan's Guardian Angels sta sostenendo progetti complementari alla propria mission. La Fondazione premia, con una borsa di studio del valore di \$ 1.000, uno studente (universitario o post-laurea) che studia un argomento qualunque relativo all'epilessia. La domanda è stata presentata da 15 persone. La borsa di studio è in amorevole memoria di Ozzie Deason e degli altri bambini con Sindrome di Jordan che la nostra comunità ha perso.

Con grande orgoglio, Jordan's Guardian Angels sta stringendo importanti partnership attraverso un enorme rete di collaborazioni che si estende in tutto il mondo. La Fondazione sta letteralmente cambiando vite attraverso il tutorato, diventando un punto di riferimento nell'ambiente delle malattie rare. Insieme, e con i nostri partner, possiamo cambiare il mondo.

# AGGIORNAMENTO SULLA RICERCA DI JORDAN'S GUARDIAN ANGELS FINO A MARZO 2022

## CONTESTO

Nel 2015 è stato riconosciuto per la prima volta che una singola mutazione puntiforme in un gruppo di geni che codifica per una famiglia di proteine chiamate Proteine Fosfatasi 2A (PP2A), potrebbe essere la causa di un disturbo congenito del neurosviluppo caratterizzato da uno spettro di sintomi come ritardo dello sviluppo (sviluppo motorio e linguaggio ritardati), ridotto tono muscolare, problemi comportamentali e talvolta epilessia. Le proteine PP2A sono espresse in tutti i tessuti umani e agiscono come modificatori/regolatori di altre proteine (chiamate i loro "substrati"), di cui possono rimuovere un piccolo gruppo chimico (chiamato "fosfato"). La presenza o l'assenza di questo gruppo fosfato determina l'attività biologica di questi substrati. In altre parole, rende attive o inattive queste proteine. Le fosfatasi PP2A possono avere effetti positivi o negativi su molte diverse funzioni cellulari e tissutali. La complessità del "sistema PP2A" deriva principalmente dalla loro struttura, in quanto un complesso PP2A funzionale è infatti costituito da tre proteine: una subunità C catalitica (che rimuove effettivamente il fosfato), una subunità B regolatrice (che determinerà quali substrati possono essere modificati) e una subunità A "scaffold" (che forma il ponte tra la subunità C e la B).

Nei disturbi dello sviluppo neurologico correlati a PP2A, possono essere mutati sia il gene che codifica per la subunità C (PPP2CA), sia il gene che codifica per la subunità A (PPP2R1A) - oppure possono essere mutati due geni (su un totale di 15) che codificano per una specifica subunità B (PPP2R5D e PPP2R5C). Finora, l'idea generale sugli effetti delle mutazioni in questi geni PP2A è che la mutazione crei una perdita di funzione, portando a una subunità disfunzionale che non può più svolgere tutte le sue funzioni, compresa la rimozione del fosfato dal suo substrato/substrati. Vi è tuttavia una generale mancanza di conoscenza su quale substrato - o più probabilmente su quali substrati - uno specifico complesso PP2A moduli, e su quale cellula o funzione tissutale (o più probabilmente funzioni tissutali), questa modulazione influisca. Nel cervello, i complessi PP2A contenenti PPP2R5D o PPP2R5C possono influenzare diversi substrati e quindi diverse funzioni neuronali o cerebrali.

Pertanto, se miriamo a intervenire terapeuticamente per invertire gli effetti delle mutazioni del gene PP2A, dobbiamo capire quali substrati e vie di segnalazione cellulare sono regolati dai complessi PP2A affetti. Dall'inizio del progetto sono stati compiuti molti progressi in questo senso.

# AGGIORNAMENTI

## Dati clinici & conoscenze di base

La dottoressa Wendy Chung e il suo team della Columbia University di New York hanno arruolato (e continuano a farlo) persone con mutazioni PPP2R5D da tutto il mondo, per gli Studi di Storia Naturale. La dottoressa Chung conferma di volta in volta l'idoneità del soggetto esaminando i referti dei test genetici e raccogliendo informazioni sul bambino dai genitori. I genitori forniscono informazioni di base durante un colloquio anamnestico, e forniscono una valutazione dello sviluppo adattivo del loro bambino attraverso la scala Vineland Adaptive Behavioral somministrata telefonicamente da un consulente genetico o un assistente della ricerca. Sono stati inoltre raccolti dati comportamentali con la Child Behavior Checklist (CBCL) e il Social Communication Questionnaire (SCQ).

Dal punto di vista clinico, il team continua a rilevare che le caratteristiche più comuni tra gli individui PPP2R5D includono ritardo dello sviluppo, autismo, ADHD (Disturbo da deficit di attenzione e iperattività), problemi comportamentali, ipotonia, macrocefalia, difficoltà di coordinazione, crisi epilettiche, disabilità visiva, scoliosi, reflusso gastroesofageo, costipazione e diarrea. I membri del team hanno sviluppato un punteggio euristico di gravità clinica. Alcune correlazioni possono ora essere effettuate anche tra l'attività biochimica e la gravità clinica.

Al Seattle Children's Hospital (Ospedale dei Bambini di Seattle), il team della dottoressa Mirzaa studia la crescita eccessiva del cervello, o Megaloencefalia - un disturbo dello sviluppo spesso associato a molteplici comorbidità tra cui epilessia, disabilità intellettiva e disturbi dello spettro autistico (DSA). La dott.ssa Mirzaa e il suo team hanno creato con successo un deposito o "banca biologica" di linee cellulari derivanti da pazienti che presentano una crescita eccessiva del cervello (MEG), comprese le linee cellulari mutanti PI3K-AKT-MTOR, nonché la linea cellulare derivata dai fibroblasti mutanti per PPP2R5D. Queste linee cellulari sono fondamentali per gli esperimenti proposti in questo progetto, ed esserne in possesso facilita fortemente il raggiungimento degli obiettivi proposti.

Il team della dottoressa Janssens presso la KU Leuven (Belgio) ha sviluppato un nuovo test biochimico per aiutare a caratterizzare la patogenicità o la non patogenicità delle nuove varianti del gene PPP2R5D. Questi dati hanno permesso al team di definire almeno tre diversi sottogruppi molecolari tra le varianti PPP2R5D attualmente note.

L'Università del South Alabama è la sede del team del dottor Honkanen, che ha eseguito analisi globali quantitative obiettive di tipo proteomico, fosfoproteomico, trascrizionale e metabolico su linee cellulari wild-type (normali) e mutate - confrontando le varianti E198K, E200K ed E420K. Per favorire lo sviluppo di oligonucleotidi antisenso (ASO), il team ha aggiunto l'analisi delle cellule PPP2R5D-Knock Out (KO), cellule in cui il gene PPP2R5D è stato eliminato.

Questi studi determineranno se i cambiamenti dovuti a ciascuna variante sono uguali, simili o diversi tra loro. Avendo finalizzato nel ciclo precedente le analisi proteomiche e fosfoproteomiche per le linee cellulari E420K, in questo ciclo il team ha concentrato gli sforzi su analisi e validazione ortogonale dei dati E198K.

Il team di Honkanen sta anche effettuando/definendo un modello di meccanica quantistica a supporto dello sforzo complessivo di comprendere la regolazione della funzione PPP2R5D nelle cellule wild type, e determinare in che modo la funzione normale venga alterata dalle varianti a livello molecolare.

## Lavoro sulle Cellule Staminali Pluripotenti Indotte (iPSC)

Il team della dottoressa Chung presso la Columbia University (New York) sta producendo Cellule Staminali Pluripotenti Indotte (iPSC) da altri 6 individui che coprono diverse varianti di PPP2R5D.

In concomitanza, il team del dottor Fink presso il Davis Institute for Regenerative Cures dell'Università della California ha differenziato queste cellule in qualsiasi tipo di cellula, compresi i neuroni.

Lo Stem Cell Core (Columbia University, New York) ha creato cinque linee specifiche per paziente, che presentano quattro delle più comuni mutazioni della Sindrome di Jordan. Tutte queste linee cellulari hanno superato rigorosi controlli di qualità per misure di potenza, oltre alla stabilità cariotipica. Il team del dottor Fink ha creato e sta espandendo e differenziando quattro linee di Cellule Staminali Pluripotenti Indotte isogeniche o "corrette" con le restanti mutazioni ancora in corso. Queste cellule di controllo sono fondamentali per comprendere l'impatto delle mutazioni PPP2R5D nei neuroni, il tipo cellulare più colpito.

Il team del dottor Fink ha anche lanciato una serie allelica di Cellule Staminali Pluripotenti Indotte (iPSC) in collaborazione con Synthego, dove hanno creato 11 mutazioni uniche in una linea parentale iPSC. Questa serie di alleli è stata ricevuta, genotipizzata, e attualmente viene ampliata e conservata all'interno del centro delle cellule staminali presso l'UC Davis. Il team del dottor Fink ha condiviso queste cellule con altri membri del gruppo e ha pianificato lo svolgimento di esperimenti per eseguire il sequenziamento dell'RNA e la proteomica.

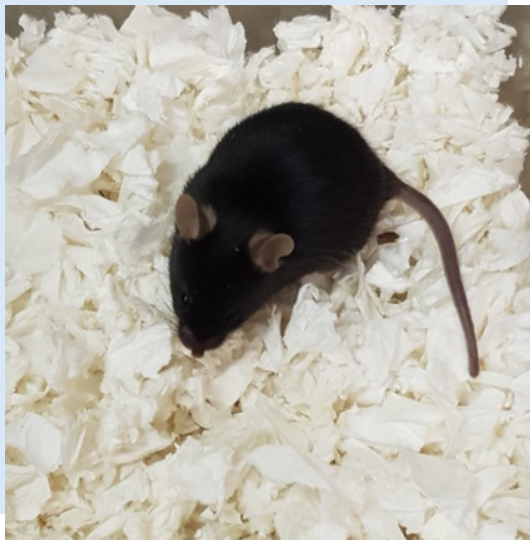
Il team del dottor Honkanen, in questo ciclo ha modificato il metodo CRISPR\_PRIME sviluppato per generare le linee E198K riportate nell'ultimo ciclo, e ha utilizzato il nuovo metodo per generare le linee varianti E200K. Inoltre, i metodi di editing CRISPR-PRIME sono stati modificati per consentire la riparazione delle varianti patogenetiche. Nell'ultimo ciclo il team è riuscito a riparare con successo le linee cellulari HEK-293 della variante E420K, e i fibroblasti umani E420K. Questo team ha ora avviato lo sviluppo di metodi per riparare la variante E198K.

All'Ospedale dei Bambini di Seattle, il team della dottoressa Mirzaa ha generato iPSC, NPC, neuroni corticali e organoidi cerebrali da diverse linee cellulari mutanti PI3K-AKT-MTOR, nonché controlli, utilizzando protocolli interni stabiliti. Il team ha eseguito con successo l'editing del genoma su queste linee cellulari per generare controlli isogenici utilizzando CRISPR-Cas9.

Queste linee cellulari saranno utilizzate in ulteriori esperimenti per confrontarle con linee cellulari mutanti PPP2R5D.

### Studi sui topi

Il team del dottor Strack presso l'Università dell'Iowa è pronto per sfruttare il modello di topo knock-in E198K per testare, come interventi terapeutici, farmaci sperimentali e approvati dall'FDA. Questi "studi preclinici" sono una precondizione per studi clinici sicuri ed efficaci sull'uomo.



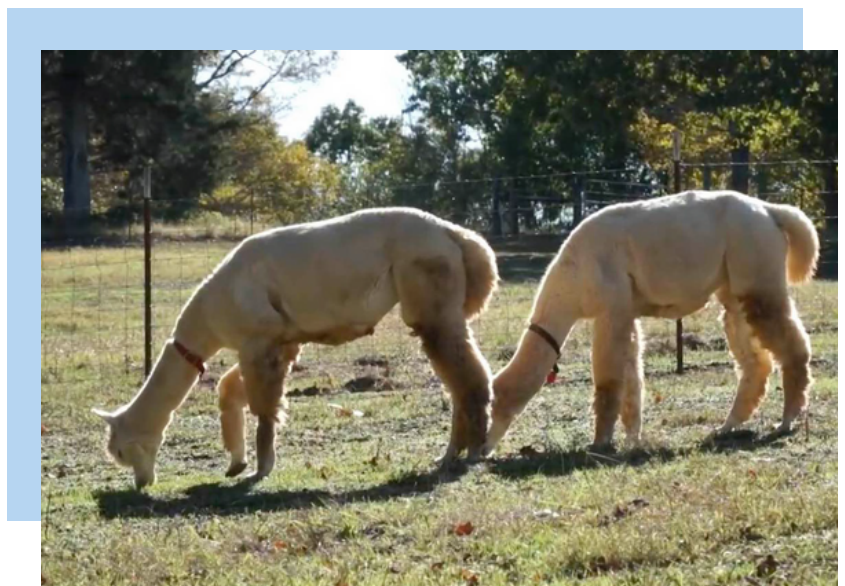
Il team del dottor Strack ha scoperto che il cervello dei topi E198K è caratterizzato da uno stato generale di ipofosforilazione di più proteine coinvolte nella trasmissione sinaptica. La fosforilazione diminuita nei cervelli con mutazione E198K è prevalentemente nei siti della proteina chinasi c-AMP dipendente (PKA): RxxS. Questo è incoraggiante, in quanto suggerisce che le mutazioni della Sindrome di Jordan potrebbero essere un acquisto di funzione (GOF, gain-of-function) e giustifica anche l'attenzione del team sull'aumento dell'attività della PKA con gli inibitori della PDE4 come strategia terapeutica.

Il team ha immediatamente avviato la riproduzione degli animali, così da espandere la nostra colonia di topi E198K per le "prove precliniche" proposte. Con piccole coorti di topi disponibili, il team del dottor Strack sta attualmente valutando diversi test / analisi della funzione cognitiva che possono essere eseguiti longitudinalmente e con fasi di assuefazione minime o assenti. Il team sta attualmente preferendo il test della memoria spaziale con labirinto a Y, per via della sua bassa variabilità inter-animale. In attesa di un numero sufficiente di topi E198K per i test, il team sta attualmente determinando percorso, dosi e i tempi ottimali di somministrazione di rolipram per ottenere miglioramenti della memoria nei topi wild-type.

Nel frattempo, il team del dottor Xia presso l'Università di Rochester ha rivisitato la curva I/O per le sinapsi Sch-CA1 dell'ippocampo E198K - e ha scoperto che esiste effettivamente un aumento della trasmissione sinaptica nel topo E198K coerente con gli studi sul rapporto E/I nel topo E420K, suggerendo che le varianti della Sindrome di Jordan accrescono la trasmissione sinaptica eccitatoria.

## Nanobodies (Nanoanticorpi) e Structure Development (Sviluppo della struttura)

Il team del dottor Wadzinski presso la Vanderbilt University, ha sviluppato dagli alpaca una pletera di anticorpi e nanoanticorpi pertinenti allo studio della Sindrome di Jordan. Molti di questi anticorpi e nanoanticorpi sono stati inviati ai colleghi del team Jordan's Guardian Angels per gli studi in corso nei loro laboratori. Questi strumenti vengono utilizzati per approfondire la comprensione della biologia molecolare delle forme wild-type e delle varianti di PPP2R5D.



Oltre allo sviluppo di molteplici anticorpi / nanoanticorpi, il team è stato anche attivamente coinvolto in studi sulla regolazione e sulla stabilità degli oloenzimi PPP2R5D.

Il team della dottoressa Xing presso l'Università del Wisconsin - Madison ha ulteriormente esaminato i set di dati ricavati tramite la cryo-EM (criomicroscopia elettronica) per le varianti wild type E197K, E198K, E200K ed E420K dell'oloenzima PPP2R5D. Un'attenta classificazione 3D ha permesso al team di calcolare la percentuale di forme attive aperte dell'oloenzima in condizioni basali per ogni variante. La conoscenza appresa da questa analisi è coerente con molte osservazioni dalla caratterizzazione biochimica delle varianti e osservazioni sulle interazioni del substrato cellulare del team della dottoressa Janssens Lab presso KU Leuven (Belgio).

Usando la cryo-EM (criomicroscopia elettronica), il team della dottoressa Xing ha determinato la struttura per la forma chiusa dell'oloenzima E197K. La struttura ad alta risoluzione rivela meccanismi strutturali critici. Tali caratteristiche strutturali forniscono spiegazioni coerenti per gli effetti delle mutazioni responsabili della disabilità intellettiva e per i meccanismi relativi a come la attivazione dovuta alla fosforilazione moduli le funzioni dell'oloenzima. Inoltre, la struttura ad alta risoluzione fornisce una base importante per lo studio "structure-guided" delle mutazioni della malattia e la ricerca "structure-guided" di farmaci che vadano a colpire/bersagliare gli oloenzimi mutanti.

## Il percorso verso un trattamento farmacologico

Siccome i dati del team Strack, e di altri team del gruppo di ricerca, indicano in modo deciso che le mutazioni della Sindrome di Jordan attivano uniformemente la funzione enzimatica di PP2A (defosforilazione dei substrati) - il gruppo di ricerca propone anche di sviluppare screening ad alta capacità (HTS, High-throughput screening) per la ricerca di inibitori selettivi dell'enzima PP2A/R5D. Questi screening di librerie costituite da prodotti chimicamente diversi e prodotti naturali, saranno svolte dal dipartimento di screening ad alta capacità (HTS, High-throughput screening) del College of Pharmacy presso l'Università dell'Iowa.

Il team del dottor Strack ha sviluppato un nuovo test sensore dell'attività di auto-rigenerazione dell'enzima PPP2A (RASP - Regenerating Activity Sensor of PPP2A) per monitorare selettivamente l'attività dell'enzima PP2A/R5D nelle cellule. Questo test valuta lo stato di fosforilazione di un substrato artificiale selettivo PPP2R5 ad alta affinità che si rigenera mediante autofosforilazione tramite la chinasi 5 dipendente dalla ciclina (CDK5) fusa al suo C-terminale. Utilizzando il test RASP, il team ha dimostrato che tutte le mutazioni della Sindrome di Jordan aumentano l'attività enzimatica dell'oloenzima PP2A.

Presso l'Università del South Alabama, il team del dottor Honkanen ha stabilito che i dati stanno iniziando ad indicare che potrebbe non esserci una singola cura adatta a tutti i sintomi - quindi il team dovrà determinare se è necessario modificare il comportamento di PPP2R5D allo stesso modo in tutte le cellule, e se i neuroni sono davvero le cellule bersaglio critiche.

È importante sottolineare come il team abbia scoperto che i farmaci esistenti che potrebbero non essere in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, e che quindi avranno poco o nessun effetto nei neuroni, possono comunque essere utili per gestire problemi intestinali, ipotonia o altri sintomi clinici che si verificano al di fuori del cervello.

Il team ha anche combinato proteomica quantitativa e fosfoproteomica quantitativa per esplorare ulteriormente i ruoli biologici di PPP2R5D e determinare se due diverse varianti patologiche alterano le medesime o diverse funzioni normali - basandosi sulle nostre osservazioni fatte studiando la condizione wild-type e la variante E420K in cellule HEK-293 fornite nei precedenti report sullo stato di avanzamento.

Gli studi preliminari del team della dottoressa Mirzaa hanno dimostrato che PPP2R5D regola i percorsi critici di crescita cellulare, incluso il percorso PI3K-AKT-MTOR. È noto che le mutazioni che attivano i componenti principali di questo percorso (PIK3CA, AKT3, MTOR, PTEN) causano effetti simil MEG, ID e ASD nei bambini; un'osservazione critica poiché è noto che molti inibitori di questo percorso sono stati usati per trattare la crescita corporale eccessiva, fenotipi di displasia, e anche il cancro. Ciò solleva l'entusiasmante possibilità di utilizzare queste terapie a bersaglio molecolare per i disturbi correlati a PPP2R5D.

Il team di Seattle ha eseguito con successo diversi test funzionali sulle linee mutanti PI3K-AKT-MTOR che hanno rivelato distinte differenze di sviluppo tra i nodi chiave nel percorso PI3K-AKT-MTOR (PIK3CA e MTOR). Il team si aspetta quindi che si potranno osservare differenze di sviluppo simili tra questi PI3K-AKT-MTOR mutanti e le linee PPP2R5D, suggerendo meccanismi patogenetici distinti per le rispettive sindromi dello sviluppo neurologico. Questi data points fornirebbero importanti spunti per future considerazioni terapeutiche utilizzando gli inibitori del percorso MTOR.

## Il percorso verso una cura (Intervento Genetico)

Il secondo progetto in corso nel laboratorio del dottor Fink presso l'Institute for Regenerative Cures è sviluppare nuovi interventi terapeutici mirati alla causa genetica che sta alla base della Sindrome. Specificatamente per la Sindrome di Jordan, il team si è concentrato su un approccio che mira al gene direttamente a livello del DNA per modificare l'espressione dell'RNA della variante o dell'allele sano, utilizzando una strategia di interferenza per ridurre l'espressione di PPP2R5D in modo selettivo, o per "correggere" la trascrizione dell'RNA utilizzando un nuovo sistema CRISPR.

Ad oggi, il team ha completato gli studi preliminari di ciascun approccio in cellule della pelle derivanti dal paziente, e ha stabilito che la correzione a livello di RNA è la più promettente. Il team del dottor Fink ha recentemente progettato e acquisito anche i costrutti per il PRIME editing nel genoma del topo per tutte le mutazioni dell'esone 5 e dell'esone 12.

I dati preliminari del team del dottor Fink suggeriscono che la correzione mirata del trascritto E198K è possibile in Cellule Staminali Pluripotenti Indotte (iPSC) neuronali derivate dal paziente - isolate da un paziente che ospita questa mutazione.

## PPP2R1A & PPP2R5C

Il team della dottoressa Janssens presso KU Leuven (Belgio) ha finalizzato una serie completa di test comportamentali nei topi PPP2R1A M180T KI - in particolare in età neonatale. Questi test hanno mostrato un ritardo dello sviluppo a vari livelli (aumento di peso e lunghezza, sviluppo delle tappe evolutive, sviluppo di alcuni riflessi, e sviluppo neuromotorio).

Il team ha avviato la raccolta di sondaggi sull'epilessia negli individui affetti da PPP2R1A. È stata ottenuta un'ulteriore caratterizzazione fenotipica dei topi PPP2R1A M180T KI, con l'obiettivo di identificare fenotipi forti e penetranti che potrebbero essere utilizzati come lettura negli studi preclinici sui topi. I dati finora sono molto incoraggianti per confermare che questi topi simulano davvero bene il disturbo e sarebbero quindi utili per gli studi preclinici. Per i topi PPP2R1A R182W KI, il verificarsi di crisi epilettiche spontanee sarebbe finora la lettura "migliore" da utilizzare negli studi preclinici. Ulteriori studi dovrebbero rivelare le migliori letture fenotipiche anche per i topi PPP2R5D E198K.

La coorte di pazienti affetti da PPP2R5C è stata significativamente estesa da 9 a 17 casi. Il team Janssens ha scoperto anche che tutte le varianti sono caratterizzate dal legame della subunità A/C, e/o da difetti del legame con liprin- $\alpha$ 1. Degno di nota il fatto che ci siano molte sorprendenti somiglianze tra i soggetti affetti da PPP2R5D e PPP2R5C, sia in termini di caratteristiche cliniche dei pazienti (ad esempio ID/DD, ipotonia, tendenza alla macrocefalia, insorgenza di crisi epilettiche) sia in termini di menomazioni biochimiche delle varianti genetiche. Inoltre, le nuove varianti PPP2R5C spesso influenzano gli stessi amminoacidi di quelli interessati nelle varianti PPP2R5D.

## RISORSE

Sul sito web di Jordan's Guardian Angels troverai risorse utili fornite da JGA per aiutare te e la tua famiglia nel vostro viaggio con la Sindrome di Jordan. Per visualizzare tutte queste risorse online, scansiona il codice QR a destra o visita [www.jordansguardianangels.org/resource-center/](http://www.jordansguardianangels.org/resource-center/).





## CHI SIAMO

Jordan's Guardian Angels è una fondazione senza scopo di lucro, con sede a Sacramento, che lavora per svelare alcuni dei più grandi misteri medici del mondo. Stiamo guidando una rivoluzionaria ricerca internazionale su una mutazione dei geni PPP2R5D, PPP2R5C e PPP2R1A nota come Sindrome di Jordan. Tra gli altri sintomi provoca ritardi dello sviluppo globale, ed è collegata ad autismo, epilessia, Morbo di Alzheimer, cancro, Morbo di Parkinson e altre condizioni.

Abbiamo unito famiglie da tutto il mondo. In collaborazione con primari istituti di ricerca, la nostra missione è creare un futuro migliore per i nostri figli e potenzialmente per milioni di altri individui attraverso una ricerca che, secondo esperti medici di fama mondiale, cambierà il mondo.

**La nostra missione: condurre una ricerca che fornisca risposte su rare mutazioni genetiche che colpiscono bambini e adulti, e assistere e migliorare la qualità della vita di bambini e famiglie.**



@JordansGuardianAngels



@JordansGuardianAngels



@JordansGAngels

1121 L St, Suite 100, Sacramento, CA 95814 | 916.441.6222 | [info@jordansguardianangels.org](mailto:info@jordansguardianangels.org)

[www.jordansguardianangels.org](http://www.jordansguardianangels.org)